การผลิตพรีไบโอติกออลิโกแซ็กคาไรด์โดยกลูแคนซูเครสจาก *Bacillus licheniformis* TH4-2

นางสาวพิชชานันท์ นิ่มพิบูลย์

ปกติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4872388223

PRODUCTION OF PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDES BY GLUCANSUCRASE FROM *Bacillus licheniformis* TH4-2

Miss Pitchanan Nimpiboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

512104

Thesis Title	PRODUCTION OF PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDES BY GLUCANSUCRASE FROM *Bacillus licheniformis* TH4-2
By	Miss Pitchanan Nimpiboon
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

S. Hannongbua ..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE

Tipaporn Limpaseni ..... Chairman

(Associate Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

P. Pongsawasdi ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

Kanoktip Packdibamrung ..... Examiner

(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

Manchumas Prousoontorn ..... Examiner

(Assistant Professor Manchumas Prousoontorn, Ph.D.)

พิชชานันท์ นิ่มพิบูลย์ : การผลิตพรีไบโอติกออลิโกแซ็กคาไรด์โดยกลูแคนซูเครสจาก *Bacillus licheniformis* TH4-2. (PRODUCTION OF PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDES BY GLUCANSUCRASE FROM *Bacillus licheniformis* TH4-2) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 127 หน้า.

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาการนำกลูแคนซูเครสที่บริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* TH4-2 มาใช้เร่งปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่กลูโคซิล เพื่อผลิตพรีไบโอติกออลิโกแซ็กคาไรด์ ขั้นตอนการทดลองเริ่มจากการหาภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้แบคทีเรียผลิตกลูแคนซูเครสในปริมาณสูง ผลของการหาสภาวะที่เหมาะสมคือ เลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย แป้งจากมันสำปะหลัง 5 % และโอวัลบูมิน 0.4 % ที่ pH 6.5, 45 °ซ เป็นเวลา 42 ชั่วโมง จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลสและเซฟาเด็กซ์ G-100 พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 112 เท่า และมีแอกทิวิตีคงเหลือทั้งหมด 28 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 64 กิโลดาลตัน pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45 °ซ เอนไซม์มีค่า K_m และ V_{max} ต่อซูโครสเท่ากับ 38.14 มิลลิโมลาร์ และ 0.042 ไมโครโมลาร์ต่อนาที ตามลำดับ เมื่อใช้ซูโครสเป็นซับสเตรต และแปรเปลี่ยนแซ็กคาไรด์ตัวรับในการสังเคราะห์พรีไบโอติกออลิโกแซ็กคาไรด์ พบว่ามีแซ็กคาไรด์ตัวรับหลายชนิดได้แก่ G2 (มอลโทส) ถึง G7 (มอลโทเฮปทะโอส), แลกโทส, เมลิไบโอส, ราฟฟิโนส, พาราทิโนส และ แลกทูโลส ที่สามารถรับหมู่กลูโคสจากซูโครสตัวให้ได้ และเกิดผลิตภัณฑ์ขึ้น จึงได้เลือกเมลิไบโอสซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ตัวรับที่มีประสิทธิภาพ และมีความน่าสนใจมาทำการศึกษาต่อ พบว่า เอนไซม์มีค่า K_m และ V_{max} ต่อเมลิไบโอส เท่ากับ 148 มิลลิโมลาร์ และ 0.0072 ไมโครโมลาร์ต่อนาที ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC และ HPLC พบว่าผลของภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ พรีไบโอติกออลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อใช้เมลิไบโอสเป็นตัวรับ คือ การบ่มเอนไซม์ 5 ยูนิตต่อมล. กับ เมลิไบโอส 15 % (w/v) และ ซูโครส 5 % (w/v) ใน 20 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่ 45 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากใช้ภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์ พบว่ามีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น 2 ชนิด คือ ผลิตภัณฑ์ A (ผลิตภัณฑ์หลัก) ที่ Rt 8.3 นาที และผลิตภัณฑ์ B (ผลิตภัณฑ์รอง) ที่ Rt 10.3 นาที ในปริมาณผลผลิต 17.2 % และ 3.3 % ตามลำดับ เมื่อเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณเป็นอัตราร้อยละใกล้เคียงกับการสังเคราะห์ในสเกลเล็ก และสามารถแยกผลิตภัณฑ์หลักด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ LH-20 เมื่อทำการพิสูจน์โครงสร้างของผลิตภัณฑ์หลักด้วยเทคนิค MS และ NMR พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักที่ Rt 8.3 นาที มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 504 ดาลตัน และมีโครงสร้างเป็นไทรแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส และเมลิไบโอสต่อกันด้วยพันธะ α-1,6 ผลิตภัณฑ์หลักชนิดนี้ มีสมบัติเร่งการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus*

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

4872388223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS : PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDE / GLUCANSUCRASE / MELIBIOSE TRANSGLUCOSYLATION

PITCHANAN NIMPIBOON: PRODUCTION OF PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDES BY GLUCANSUCRASE FROM *Bacillus licheniformis* TH4-2. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D., 127 pp.

The aim of the present study was to use glucansucrase from *Bacillus licheniformis* TH4-2 in the glucosyl transfer reaction for production of prebiotic oligosaccharide. Experimental steps started with optimization of cultivation condition for high glucansucrase production. The optimized condition was 42 hours of cultivation in the medium containing 5 % soluble starch from cassava supplemented with 0.4% ovalbumin at pH 6.5, 45° C. The enzyme was then purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. The specific activity of the enzyme was 112 fold increased with 28% yields of total activity. The molecular mass of the purified enzyme was 64 kDa as measured by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature were 6.0 and 45°C, respectively. The apparent K_m and V_{max} values for sucrose substrate were 38.14 mM and 0.042 μmole/min, respectively. The enzyme was able to synthesize a variety of prebiotic oligosaccharides from sucrose donor using various saccharides as glucosyl acceptor, such as G2 (maltose) to G7 (maltoheptaose), lactose, melibiose, cellobiose, raffinose, palatinose and lactulose. Melibiose was found to be one of the efficient and interesting glucosyl acceptors. The apparent K_m and V_{max} values for melibiose acceptor were 148 mM and 0.0072 μmole/min, respectively. From product analysis using TLC and HPLC, the optimum condition for oligosaccharide production obtained was 15% (w/v) melibiose (acceptor), 5% (w/v) sucrose (donor), glucansucrase concentration 5U/ml at pH 6.0, 45°C for 24 hours. After optimization, two product peaks from HPLC profile were obtained from glucosyl transfer to melibiose acceptor, main product (product A at Rt 8.3 min) and minor product (product B at Rt 10.3 min) with the yields of 17.2% and 3.3%,respectively. Reaction products were then prepared in larger scale, where similar percent yield of the two products was obtained. The main product was isolated from other sugars present in the reaction mixtures by Sephadex LH-20 column. The structured identification of the main product by MS and NMR revealed the trisaccharide structure of 504 daltons of melibiose linked by an α-1,6 bond with one molecule of glucose. The main product can support significant growth of *Lactobacillus acidophilus*.

Field of study BIOTECHNOLOGY Student's signature Pitchanan Nimpiboon

Academic year 2008 Advisor's signature P. Pongsawasdi

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi, for her excellent instruction, guidance, encouragement, attention and support throughout this thesis.

Sincere thanks and appreciation are also extended to Associate Professor Dr. Tipaporn Limpaseni, Assistant Professor Dr. Kanoktip Packdibamrung and Assistant Professor Dr. Manchumas Prousoontorn who serve as the members of the Master committees, for their helpful suggestions and comments.

My thanks must be expressed to all staff members of Research Centre of Bioorganic Chemistry (RCBC), for their assistance and helpfulness especially Associate Professor Dr. Surachai Pornpakakul at Chemistry Department. Moreover, my thanks also go to all staff members and friends in the Department of Biochemistry and Biotechnology program, for their assistance and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents for their encouragement, willpower and heartiness support throughout my life.

Financial supports from the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksompote Endowment Fund) and Ratchadaphiseksompote Endowment Fund to Starch and Cyclodextrin Research Unit are gratefully acknowledged.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT THAI iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES xiii

LIST OF FIGURES xiv

LIST OF ABBREVIATIONS xvii

CHAPTER I INTRODUCTION 1

1.1 Oligosaccharides 1

1.1.1 Chemical composition of oligosaccharides 1

1.1.2 Properties of oligosaccharides 2

1.2 Prebiotics 5

1.3 Probiotics 7

1.3.1 Utilization of prebiotics by probiotics 8

1.4 Oligosaccharide production 11

1.4.1 Chemical production 11

1.4.2 Enzymatic production 12

1.4.2.1 Glycosyltransferase 12

1.4.2.2 Glycosidase 13

1.4.2.2.1 Equilibrium-controlled synthesis 13

1.4.2.2.2 Kinetically-controlled synthesis 14

1.4.3 Current commercial oligosaccharide production process 15

1.5 Glucansucrase (EC 2.4.1) 17

1.5.1 Polymerization reaction 18

1.5.2 Hydrolysis reaction 18

PAGE

1.5.3 Acceptor reaction..... 19

1.6 Transglucosylation activity for synthesis of prebiotic oligosaccharides by glucansucrase..... 19

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS..... 24

2.1 Equipments..... 24

2.2 Chemicals..... 25

2.3 Bacteria..... 27

2.4 Media preparation..... 28

2.4.1 Enrichment medium..... 28

2.4.2 Enzyme production medium..... 28

2.5 Optimization of cultivation condition for high levansucrase production..... 28

2.5.1 Starter inoculum..... 28

2.5.2 Optimum carbon source..... 29

2.5.3 Optimum concentration of carbon source..... 29

2.5.4 Optimum cultivation temperature..... 29

2.5.5 Optimum cultivation time..... 30

2.6 Production of Glucansucrase..... 30

2.6.1 Starter inoculum..... 30

2.6.2 Enzyme production..... 30

2.7 Purification of Glucansucrase..... 31

2.7.1 Ammonium sulfate precipitation..... 31

2.7.2 DEAE-cellulose chromatography..... 31

2.7.3 Sephadex G-100 chromatography..... 32

2.8 Enzyme assay..... 33

2.9 Protein determination..... 33

2.10 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)..... 34

PAGE

2.10.1 Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE).....34
2.10.2 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)..... 34
2.10.3 Detection of proteins.....35
2.10.3.1 Coomassie blue staining..... 35
2.10.3.2 Activity staining.....35
2.11 Characterization of Glucansucrase..... 36
2.11.1 Determination of molecular weight..... 36
2.11.2 Effect of pH on the enzyme activity..... 36
2.11.3 Effect of temperature on the enzyme activity.....36
2.11.4 Kinetic studies of glucansucrase.....37
2.11.4.1 Determination of K_m and V_{max} for sucrose substarte...37
2.11.4.2 Determination of K_m and V_{max} for melibiose acceptor37
2.12 Synthesis and detection of oligosaccharides products.....38
2.12.1 Acceptor specificity..... 38
2.12.2 Detection of products.....38
2.12.2.1 Thin layer chromatography (TLC).....38
2.12.2.2 High performance liquid chromatography (HPLC)...38
2.11.3 Determination of transglucosylation efficiency.....39
2.13 Optimization of transglucosylation reaction.....39
2.13.1 Effect of acceptor concentration.....39
2.13.2 Effect of donor concentration..... 40
2.13.3 Effect of enzyme concentration..... 40
2.13.4 Effect of pH.....40
2.13.5 Effect of temperature..... 41
2.13.6 Effect of incubation time..... 41
2.14 Larger scale preparation and isolation of OS products..... 41

PAGE

2.15 Characterization of OS products..... 42
2.15.1 Mass Spectrometry..... 42
2.15.1 Nuclear Magnetic Resonance..... 42
2.16 Determination of properties of OS product..... 43
2.16.1 Monitoring of bioactivity of OS product in supporting growth of *Lactobacillus acidophilus*..... 43
2.16.1.1 Starter inoculum..... 43
2.16.1.2 Various carbon source..... 43
CHAPTER III RESULTS..... 44
3.1 The optimum culturing condition for high glucansucrase production.... 44
3.1.1 Optimum carbon source..... 44
3.1.2 Optimum concentration of carbon source..... 46
3.1.3 Optimum cultivation temperature..... 46
3.1.4 Optimum cultivation time..... 46
3.2 Purification of glucansucrase..... 50
3.2.1 Preparation of crude enzyme..... 50
3.2.2 Enzyme purification steps..... 50
3.2.2.1 Ammonium sulfate precipitation..... 50
3.2.2.2 DEAE-cellulose column chromatography..... 51
3.2.2.3 Sephadex G-100 chromatography..... 51
3.2.3 Determination of enzyme purity..... 52
3.3 Characterization of purified glucansucrase..... 57
3.3.1 Molecular weight determination of glucansucrase..... 57
3.3.2 Optimum pH..... 57
3.3.3 Optimum temperature..... 57
3.3.4 Kinetics of glucansucrase..... 61
3.3.4.1 Determination of K_m and V_{max} for sucrose substrate.. 61

PAGE

3.3.4.2 Determination of K_m and V_{max} for melibiose acceptor.....61

3.4 Synthesis and detection of prebiotic oligosaccharide products..... 63

3.4.1 Acceptor specificity.....63

3.5 Optimization of transglucosylation reaction.....70

3.5.1 Effect of concentration of melibiose acceptor..... 70

3.5.2 Effect of concentration of sucrose donor..... 73

3.5.3 Effect of enzyme concentration..... 73

3.5.4 Effect of pH.....78

3.5.5 Effect of temperature..... 78

3.5.6 Effect of incubation time..... 83

3.6 Larger scale preparation and isolation of glucosyl melibiose products... 87

3.7 Characterization of Product..... 88

3.7.1 Mass spectrometry..... 88

3.7.1 Nuclear Magnetic Resonance..... 88

3.8 Determination of biological activity of product..... 96

3.8.1 Monitoring of biological activity of OS product in supporting growth of *Lactobacillus acidophilus*..... 96

3.8.1.1 Various supplements.....96

CHAPTER IV DISCUSSION.....98

4.1 The optimum culturing condition for high glucansucrase production....98

4.2 Purification of glucansucrase.....99

4.3 Characterization of purified glucansucrase.....101

4.4 Synthesis and detection of prebiotic oligosaccharide products..... 103

4.5 Optimization of transglucosylation reaction..... 105

4.6 Large scale preparation and isolation of glucosyl melibiose..... 106

4.7 Characterization of Product..... 108

PAGE

4.8 Determination of biological activity of product.....109

CHAPTER V CONCLUSIONS.....110

REFERENCES..... 112

APPENDICES..... 120

BIOGRAPHY.....127

LIST OF TABLES

TABLE **PAGE**

1.1 Various kinds of commercially available oligosaccharides.....4

1.2 Properties of oligosaccharides.....4

1.3 Non-digestible oligosaccharides with bifidogenic functions commercially available.....6

3.1 Purification of glucansucrase from *Bacillus licheniformis* TH4-2.....55

3.2 Rf values from TLC analysis of standard saccharides, various acceptors and the reaction products.....67

3.3 The total number of products from TLC analysis of the reaction products obtained from various acceptors.....68

3.4 Yields of transglucosylated products determined from peak areas at different melibiose concentrations.....71

3.5 Yields of transglucosylated products expressed as peak areas and product yield (%) at different sucrose concentrations.....74

3.6 Yields of transglucosylated products expressed as peak areas and product yield (%) at different GS concentrations.....76

3.7 Yields of transglucosylated products expressed as peak areas and product yield (%) at different pH.....79

3.8 Yields of transglucosylated products expressed as peak areas and product yield (%) at different incubation temperatures.....81

3.9 Yields of transglucosylated products expressed as peak areas and product yield (%) at different incubation times.....84

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

1 .1 Showing the beneficial bacteria in different parts of human and mammalian gut.....7
1.2 Targets throughout the gastrointestinal tract for functional-food ingredients.. 9
1.3 Schematic showing the possible mechanisms of prebiotic action..... 10
1.4 Typical chemical synthesis of a disaccharide..... 11
1.5 Schematic representation of production processes of non-digestibleoligo-saccharides..... 16
3.1 Effect of various carbon source on growth and glucansucrase (GS) production..... 45
3.2 Effect of the concentration of soluble starch from cassava on bacterial growth and glucansucrase production.....47
3.3 Effect of cultivation temperature on bacterial growth and glucansucrase production..... 48
3.4 Effect of cultivation time on bacterial growth and glucansucrase production..... 49
3.5 DEAE-cellulose chromatography of glucansucrase..... 53
3.6 Sephadex G-100 chromatography of glucansucrase.....54
3.7 Non-denaturing PAGE of glucansucrase from different purification steps.....56
3.8 SDS-PAGE of glucansucrase from defferent purification steps.....58
3.9 Calibration curve for molecular weight of glucansucrase on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis..... 59
3.10 Effect of pH on enzyme activity.....60
3.11 Effect of temperature on enzyme activity..... 60

FIGURE **PAGE**

3. 12A Lineweaver-Burk plot of glucansucrase activity with sucrose as donor substrate..... 62

3.12B Lineweaver-Burk plot of glucansucrase activity with melibiose as glucosyl acceptor..... 62

3.13 TLC chromatogram of reaction products of glucansucrase incubated with sucrose donor and various of acceptor (G1 to G7) for 24 hours.....65

3.14 TLC chromatogram of reaction products of glucansucrase incubated with sucrose donor and non-maltooligosaccharide acceptors (lactose, melibiose, cellobiose, raffinose, palatinose and lactulose) for 24 hours..... 66

3.15 HPLC chromatogram of reaction products of glucansucrase with sucrose donor and melibiose acceptor..... 69

3.16 Effect of melibiose concentration on transglucosylation yield..... 72

3.17 Effect of sucrose concentration on transglucosylation yield..... 75

3.18 Effect of glucansucrase concentration on transglucosylation yield.....77

3.19 Effect of pH on transglucosylation yield..... 80

3.20 Effection of incubation temperature on transglucosylation yield..... 82

3.21 Effect of incubation time on transglucosylation yield..... 85

3.22 HPLC chromatogram of reaction products of glucansucrase with melibiose acceptor and sucrose donor..... 86

3.23 Sephadex LH-20 column profile of reaction products..... 89

3.24 HP LC chromatography of peak I to III from Sephadex LH-20 column..... 90

3.25 ES I-TOF mass spectrum of the product A at Rt 8.3 min..... 91

3.26 The 400 MHz ^{1}H-NMR spectrum of the product A at Rt 8.3 min.....92

3.27 The 100 MHz ^{13}C-NMR spectrum of the product A at Rt 8.3 min..... 93

3.28 HSQC spectrum of the pr oduct A at Rt 8.3 min.....94

3.29 HMBC spectrum of th e product A at Rt 8.3 min.....95

FIGURE **PAGE**

3.30A The growth curves of *Lactobacillus acidophilus* grown in MRS medium supplement with various carbon sources at 2% w/v..... 97

3.30B The expanded growth curves from A when the positive control was left out..... 97

ABBREVIATIONS

A	absorbance
BSA	bovine serum albumin
°C	degree Celsius
^{13}C-NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance
Da	dalton
DEAE	diethylaminoethyl
ESI-TOF-MS	Electrospray Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
GOS	Gluco-oligosaccharide
g	gram
^{1}H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	kiloDalton
K_m	Michaelis constant
L	litre
GS	Glucansucrase
µg	microgram
µl	microlitre
M	molar
min	minute
ml	millilitre
MW	molecular weight
NDOs	the non digestible oligosaccharides
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
Rf	relative mobility
Rt	retention time
SDS	sodium dodecyl sulfate
U	unit(s)
V_{max}	maximum velocity
w/v	weight by volume